



TITLE:

Study of bacterial cellulose synthase by recombinant protein(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sun, Shijing

CITATION:

Sun, Shijing. Study of bacterial cellulose synthase by recombinant protein. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20450>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-03-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	孫世静
論文題目	Study of bacterial cellulose synthase by recombinant protein （組換え体タンパク質によるバクテリアセルロース合成酵素に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
<p>セルロースは植物細胞壁の主成分であり、バイオマス利用における主要成分の一つである。その生合成は細胞膜に存在するセルロース合成酵素複合体によって行われるが、その酵素反応機構の理解は分子細胞生物学的理解に比較して遅れている。そこで本論文ではバクテリアをモデルとして採用し、セルロース合成酵素がセルロースを合成するメカニズムの解明研究を、組換え体タンパク質を用いて行った。</p> <p>第1章では、セルロースの生合成と構造に関する過去の研究を紹介し、これらの関係性について詳述している。植物以外の生物が合成するセルロースもすべてI型結晶のミクロフィブリル構造を持つことから、植物のセルロース生合成研究の実験モデルとしてバクテリアを使用することの妥当性について述べている。</p> <p>第2章では、酢酸菌由来のセルロース合成酵素を大腸菌で異種発現することで大腸菌にセルロースを合成させることが可能であることを示した。この際、セルロース合成酵素としてCesAとCesBという二つのタンパク質と、c-di-GMP（cyclic-di-guanylnophosphate）というCesAの活性化分子の細胞内産生が必要であることを確認した。合成されたセルロースは重合度700程度の高分子量であったがI型結晶ではないことから、天然活性の再構成には至らなかったことを確認した。</p> <p>第3章では、第2章で構築したセルロースの大腸菌合成系（CESEC）を利用し、セルロース合成酵素の触媒サブユニットであるCesAの点変異体を28点作出して合成活性を定量評価した。その結果、本CESEC法により簡便に機能欠損変異体を選抜できることを示した。その一例として、既報のX線結晶構造解析の結果からその主鎖カルボニル基が基質セルロース分子と相互作用することが示されたシステイン残基について、その側鎖も機能に積極的に関わっていることを示し、構造解析データの解釈をより深めることに成功した。</p> <p>第4章においては、第2章（セルロース合成酵素大腸菌内再構成）でセルロースI型結晶構造を合成できなかった理由として、セルロース合成酵素を発現させただけでは、大腸菌でセルロース合成酵素複合体が規則的な配列構造であるターミナルコンプレックスを形成していない可能性を推測した。このことを確かめる基礎固めとして、酢酸菌のターミナルコンプレックスに含まれる分子について免疫顕微鏡法による調査を行った。その結果、既報のCesDタンパク質とともに、触媒サブユニットであるCesAタンパク質がターミナルコンプレックスに含まれることを初めて実験的に示した。</p> <p>以上より、本研究は、セルロース合成酵素の組換え体タンパク質による生化学的解析を可能にする実験系を開発することに成功し、変異体解析にも使用できることを示した。本系はセルロース合成酵素の構造・機能相関解析をより簡便に行える点で既報にはない特徴をもち、セルロース生合成の生化学的・酵素学的な理解を今後より一層深めることに寄与することが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

セルロースは植物細胞壁の半量を占める主成分であるにもかかわらず、その生合成機構の研究は、特に生化学的理解の点で遅れている。本研究は、植物のセルロース合成酵素の生化学的理解を進めるために、バクテリアのセルロース合成酵素をモデルとして採用することでセルロース合成酵素の作業機構に関する研究を行ったものである。評価すべき点は下記の通りである。

1. 酢酸菌のセルロース合成酵素を大腸菌に発現させることで、合成されたセルロースは天然構造のI型結晶構造のマイクロフィブリルとはならなかったが、高分子量のセルロースであり、セルロース合成酵素の機能を大腸菌に再構成した初めての実験例を示すことができた。
2. 上記で構築した大腸菌合成系を用いて、既報の立体構造モデルに照らして機能上重要と思われるアミノ酸を不活化変異させた場合で、セルロース合成活性が確かに低下する現象を示し、本実験系によりセルロース合成酵素の機能解析が可能であることを示した。また構造モデルに基づき提案されていたセルロース合成の分子機構をより詳細に説明する知見も得られ、本実験系は今後のセルロース生合成研究に資するものであると認められた。
3. セルロース生産性生物の細胞膜に存在するセルロース合成酵素複合体は、ターミナルコンプレックスと呼ばれる特徴的な粒子構造の配列を形成する。免疫顕微鏡法を用いて、バクテリアのターミナルコンプレックスに触媒サブユニットであるCesAが含まれることを初めて証明した。また免疫ラベルの条件を系統的に変えることで、CesAとCesDの2つのタンパク質の細胞内局在について考察し、酢酸菌のセルロース合成酵素複合体におけるサブユニット配置について新規モデルを提案した。

以上のように、本研究は、バイオマス形成機構の研究ではあまり例を見ない、酵素・タンパク質レベルの科学的アプローチによりセルロース合成酵素の研究を行ったものであり、今後セルロース生合成の研究を切り拓く基盤として重要な価値を持つとともに、森林バイオマス化学、植物細胞壁工学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）